

Verfahren und Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen

Publication number: DE19829657

Publication date: 1999-02-04

Inventor: KLIMANT INGO DR (DE)

Applicant: KLIMANT INGO DR (DE)

Classification:

- International: G01N21/64; G01N21/64; (IPC1-7): G01N21/64; C09K11/06; C09K11/77; C09K11/87; G01N33/533

- European: G01N21/64H

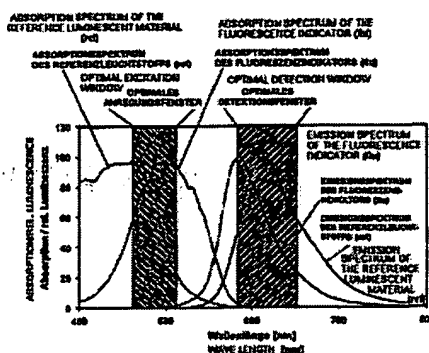
Application number: DE19981029657 19980702

Priority number(s): DE19981029657 19980702; DE19971033341 19970801

Report a data error here

Abstract of DE19829657

The invention relates to a method and a device for the fluorometric determination of a biological, chemical or physical parameter of a sample, using at least two different luminescent materials, the first of which responds to the parameter at least as regards luminescence intensity and the second of which does not respond to the parameter as regards luminescence intensity and decay time. The luminescent materials have different decay times. The time or phase behaviour of the luminescence response obtained is used to generate a reference variable for determining a parameter.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 29 657 A 1**

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 21/64
G 01 N 33/533
C 09 K 11/06
C 09 K 11/77
C 09 K 11/87

21 Aktenzeichen: 198 29 657.6
22 Anmeldetag: 2. 7. 98
43 Offenlegungstag: 4. 2. 99

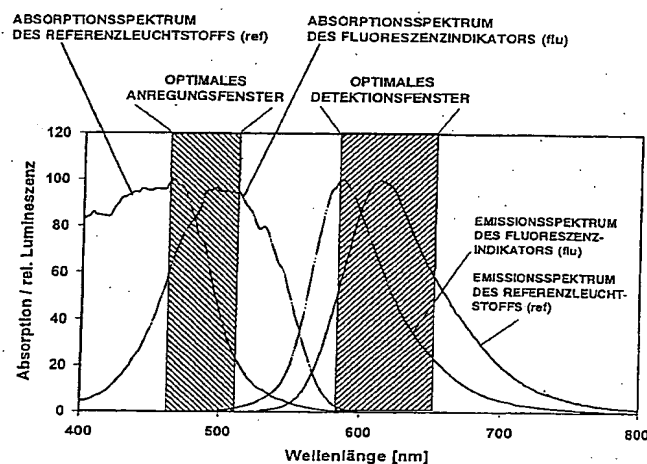
66 Innere Priorität:
197 33 341.9 01. 08. 97
71 Anmelder:
Klimant, Ingo, Dr., 93051 Regensburg, DE
74 Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

72 Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren und Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen

57 Ein Verfahren und eine Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen, chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe benutzt zumindest zwei verschiedene Leuchtstoffe, deren erster zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht, und deren zweiter zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den Parameter nicht anspricht. Die Leuchtstoffe weisen unterschiedliche Abklingzeiten auf. Das Zeit- oder Phasenverhalten der sich ergebenden Lumineszenzantwort wird zur Bildung einer Referenzgröße für die Bestimmung eines Parameters herangezogen.



DE 198 29 657 A 1

DE 198 29 657 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine in einem Spektralphotometer verwendbare Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen, chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe unter Verwendung zumindest zweier verschiedener Leuchtstoffe, deren erster zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter an-

spricht und deren zweiter zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den Parameter nicht anspricht. Insbesondere betrifft die Erfindung ein neues Konzept zur optischen Detektion von chemischen Parametern mit Hilfe von optischen Sensoren, auf der Basis von Phasenverschiebungs- und zeitaufgelösten Messungen. Die verwendeten Modulationsfrequenzen liegen zwischen 0,5 und 5 MHz und sind mit preiswerten optischen Halbleiterbauteilen erfassbar.

Aus der Literatur und der Praxis optischer Sensoren ist bekannt, daß bei Lumineszenzmessungen die Bestimmung der Abklingzeit anstelle der Intensität als Meßgröße entscheidende praktische Vorteile aufweist. Diese Größe wird durch Schwankungen des optischen Systems nur unwesentlich oder im besten Fall überhaupt nicht beeinflusst. Sowohl Veränderungen der Intensität der Lichtquelle und der Empfindlichkeit des Photodetektors als auch Signalverluste durch Biegung von Fasern oder Beeinflussung der Signalintensität durch Veränderung der Geometrie des Sensors haben keine Auswirkungen auf das Meßsignal. Dies gilt auch für undefinierte optische Eigenschaften der Probe (wie Trübung, Eigenfärbung und Brechungsindex), die zu Problemen bei Intensitätsmessungen führen können.

Desweiteren gibt es in vielen Fällen eine weitgehende Unabhängigkeit des Meßsignals von der Konzentration des Indikators in der sensitiven Schicht. Deswegen sind Photozerersetzung und Auswaschen in geringen Maßen wenig kritisch.

In der Literatur wurden eine Vielzahl von Meßprinzipien vorgeschlagen, um chemische Parameter auf Abklingzeitbasis zu messen. Eine der am häufigsten angewendeten Methoden ist die dynamische Lumineszenzlöschung, wobei der angeregte Zustand eines Lumineszenzindikators durch den Analyten strahlungslos deaktiviert wird. Auf dieser Grundlage erfolgt die optische Messung von molekularem Sauerstoff, sowie der Nachweis von Halogenid- und Schwermetallionen (1).

Eine weitere Möglichkeit der Deaktivierung nutzt den photoinduzierten Elektronentransfer in einem einzelnen Indikatormolekül. Bei diesem Effekt (kurz PET genannt) liegt der Lumineszenzindikator in verschiedenen Formen vor, von denen nur eine (saure Form oder mit gebundenem Metallion) hoch lumineszierend ist und eine lange Lebensdauer aufweist. In der zweiten Form (basische Form oder ohne gebundenes Metallion) besitzt der Indikator ein freies Elektronenpaar, welches es den angeregten Zustand strahlungslos deaktivieren kann. Als Folge verringert sich sowohl die Abklingzeit als auch die Lumineszenzquantenausbeute. Dieses Prinzip kann Anwendung finden für die optische Bestimmung des pH-Wertes oder in der optischen Ionensensorik (2).

Eine weitere vorgeschlagene Möglichkeit der Abklingzeitmessung besteht darin, daß bestimmte pH-Indikatoren im protonierten und deprotonierten Zustand mit unterschiedlicher Intensität und unterschiedlicher, aber definierter Abklingzeit lumineszieren. Dabei handelt es sich z. B. um Derivate von Seminaaphthofluorescein. In diesem Fall wird die Lumineszenz der sauren und der basischen Form simultan vermessen. Aus dem jeweiligen (pH abhängigen) Verhältnis der beiden Intensitäten ergibt sich dabei eine mittlere Abklingzeit, die gemessen werden kann (3). Voraussetzung bei dieser Methode ist, daß beide Formen eines Indikators lumineszieren, und ihre Absorptions- und Emissionsspektren deutliche Überlappungsbereiche aufweisen.

Es ist wichtig anzumerken, daß bei den meisten der bisher zitierten Meßprinzipien die gemessenen Abklingzeiten in der Regel im Bereich von wenigen Nanosekunden liegen. Die genaue Messung von Abklingzeiten im unteren Nanosekundenbereich ist aber instrumentell sehr aufwendig und erfordert neben sehr schnellen Schaltungen und hohen Modulationsfrequenzen auch schnelle Lichtquellen und Detektoren. Die Entwicklung von preiswerten Meßgeräten für diese Art von Sensoren, auf der Basis von optischen Halbleiterkomponenten wie Leuchtdioden und Photodioden scheint deswegen in naher Zukunft ziemlich ausgeschlossen. Preiswerte Meßgeräte sind aber für eine weitgefächerte Anwendung optischer Sensoren unabdingbar. Deswegen besteht ein großes Interesse an Abklingzeitsensoren, deren Meßbereich sich im Bereich von Mikrosekunden oder sogar Millisekunden bewegt. Solche Sensoren wurden bisher fast ausschließlich für die optische Sauerstoffmessung bis zur Praxisreife entwickelt, wobei Indikatoren mit Abklingzeiten bis zu einigen Millisekunden zum Einsatz kommen.

Ein kürzlich eingeschlagener Weg, neue langlebige Abklingzeitsensoren zu entwickeln, nutzt den strahlungslosen Energietransfer zwischen einem lumineszierenden Donormolekül, dessen photophysikalische Eigenschaften durch den Analyten nicht beeinflusst werden, auf einen für den Analyten sensitiven Farbindikator, der als Akzeptor bezeichnet wird. Dessen Absorptionsspektrum muß abhängig von der jeweiligen Analytkonzentration unterschiedlich stark mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappen. Als lumineszierender Donor können Übergangsmetallkomplexe mit Ruthenium(II), Ruthenium(I) oder Osmium und Iridium als Zentralatom eingesetzt werden. Diese Verbindungen zeichnen sich durch lange Lebenszeiten (einige 100 nsec bis wenige Mikrosekunden) und hohe Quantenausbeuten aus. Dieser Weg wurde erstmalig von Lakowicz vorgeschlagen und kürzlich für optische pH-Sensoren umgesetzt, wobei die analoge Realisierung von Optoden für die $p\text{CO}_2$ -, NH_3 - und die Ionendetektion grundsätzlich möglich ist (4, 5).

Ein gravierendes Problem beim praktischen Einsatz solcher Sensoren besteht darin, daß die Rate des Energietransfers und damit die meßbare mittlere Abklingzeit zum einen signifikant vom Abstand und der Positionierung von Donor und Akzeptormolekül abhängig ist, zum anderen aber auch von der Konzentration des Akzeptors in der Matrix. Aus diesem Grund führt jede Veränderung der Verteilung und des Abstands der Indikatoren in der Matrix zu Veränderungen in der Kennlinie der Sensoren. Insbesondere die Quellung der Matrix stellt ein erhebliches Problem dar.

Ein weiteres Problem ist der Einfluß von Sauerstoff auf die Sensoren. Da die Lumineszenz der eingesetzten langlebigen Donoren von Sauerstoff zum Teil beträchtlich gelöscht wird, muß die Sauerstoffkonzentration mitgemessen und das Meßsignal korrigiert werden. Zusätzlich entsteht bei diesem Prozeß in der Membran reaktiver Singletsauerstoff, der die Photozerersetzung der immobilisierten Indikatoren beschleunigt. Damit wird sowohl die Lager- als auch die Langzeitstabilität der Sensoren herabgesetzt. Damit geht natürlich einer der klassischen Vorteile der Abklingzeitmessung verloren.

Aus der US 5,102,625 ist eine Vorrichtung der eingangs genannten Art bekannt. Dort werden mittels zweier separater Meßkanäle die Intensitäten zweier Leuchtstoffe separat gemessen. Deren Intensitätsverhältnis wird als Endsignal für die

Messung des Parameters verwendet. Die Abklingzeiten der Leuchtstoffe gehen in die Messung nicht ein. Die beiden Leuchtstoffe haben unterschiedliche Spektralbereiche.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung des Parameters einer Probe anzugeben, das bei hoher Meßgenauigkeit mit geringerem apparativen Aufwand auskommt.

Zur Lösung der Aufgabe wird ein Verfahren mit den Merkmalen von Anspruch 1 und eine Vorrichtung mit den Merkmalen von Anspruch 21 vorgeschlagen.

Die Erfindung beschreibt ein neues Meßprinzip, welches die fluorometrische Bestimmung verschiedener chemischer, physikalischer und biologischer Parameter mit Hilfe von zeitaufgelösten- und Phasenmodulationstechniken ermöglicht. Die Erfindung erlaubt es, das Intensitätssignal der meisten in der Literatur beschriebenen Fluoreszenzsensoren durch Zumischen eines langlebigen Leuchtstoffs sehr effektiv zu referenzieren. Dazu werden zwei verschiedene Leuchtstoffe gemeinsam im Sensor co-immobilisiert. Die Summe aus einem Lumineszenzsignal mit konstanter langlebiger Abklingzeit (mind. einige hundert Nanosekunden) und einem kurzlebigen Fluoreszenzsignal wird gemessen. Während die langlebige Lumineszenz in ihren Parametern vom Analyten nicht beeinflusst wird, verändert sich die Intensität des co-immobilisierten kurzlebigen Leuchtstoffs in Abhängigkeit von der jeweiligen Analytkonzentration. Da die durch Phasenmodulationstechniken ermittelte Phasenverschiebung Φ_m nur vom Verhältnis der Intensitätsanteile der beiden einzelnen Leuchtstoffe abhängt, spiegelt sich in diesem Parameter direkt die Intensität des auf den Parameter ansprechenden Leuchtstoffs wieder. Damit handelt es sich bei der Erfindung um ein neues Verfahren der internen Referenzierung der Signalintensität von Fluoreszenzleuchtstoffen, ohne daß eine zweite Lichtquelle oder ein zweiter Photodetektor benötigt wird. Unter der Voraussetzung, daß die Verteilung der beiden Leuchtstoffe beim Herstellungsprozeß konstant gehalten wird, ist Φ_m ausschließlich vom zu bestimmenden physikalischen oder chemischen Parameter abhängig, während Schwankungen im optoelektronischen System, Verlusten in den Lichtleitern und den optischen Eigenschaften der Probe das Signal nicht beeinflussen.

Bevorzugt ist, daß beide Leuchtstoffe im gleichen Wellenlängenbereich Licht absorbieren und damit mit der gleichen Lichtquelle zur Lumineszenz angeregt werden können. Bevorzugt liegen die Emissionsspektren im gleichen Spektralbereich. So ist es z. B. möglich, beide Leuchtstoffe mit blauem Licht bei einer Wellenlänge von 450 nm anzuregen, wobei ein Leuchtstoff grünes Licht bei 520 nm und der zweite rotes Licht bei 600 nm emittiert, da beide Signale trotzdem mit demselben Detektor gemessen werden können. Es ist aber auch möglich, die Lumineszenz zweier Leuchtstoffe simultan zu messen, die sich in ihren Emissionsspektren deutlich voneinander unterscheiden.

Das beschriebene Meßverfahren hat den Vorteil, daß der langlebige Leuchtstoff keine analytische Reaktion aufweisen muß, sondern einzig als Träger eines konstanten Untergrundsignals mit langer Abklingzeit fungiert, welches durch den kurzlebigen Leuchtstoff moduliert wird. Aus diesem Grund kommt eine Vielzahl von in der Literatur beschriebenen phosphoreszierenden Verbindungen für diesen Zweck in Frage.

Der langlebige Leuchtstoff braucht nicht mit der Probe, dem Analyten und dem Fluoreszenzindikator in Wechselwirkung zu treten und kann deswegen in einer Form immobilisiert werden, in der er für sämtliche Probenkomponenten inert ist und damit potentielle Interferenzen durch chemische Parameter von vornherein ausgeschlossen sind.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen erläutert.

Fig. 1 zeigt die Abhängigkeit des gemessenen Phasenwinkels Φ_m von dem Verhältnis der Intensität des Fluoreszenzindikators und des Referenzleuchtstoffs; A hohes Fluoreszenzsignal, B niedriges Fluoreszenzsignal. Es bezeichnen: flu = variables Fluoreszenzsignal; ref = konstantes Referenzsignal; ges = gemessenes Gesamtsignal;

Fig. 2 zeigt einen berechneten Zusammenhang zwischen dem gemessenen Phasenwinkel Φ_m sowie $\cot(\Phi_m)$ und dem Amplitudenverhältnis R der beiden Leuchtstoffe;

Fig. 3 zeigt spektrale Eigenschaften eines geeigneten Paares von Fluoreszenzindikator und Referenzleuchtstoff. Die optimalen spektralen Fenster für die Anregung des Lumineszenzsignals und die Messung des emittierten Lichtes sind schraffiert eingezeichnet;

Fig. 4 zeigt eine zeitaufgelöste Messung des Verhältnisses der Signalintensität während des Anregungsimpulses (I_1) und während des Abklingens der Lumineszenz (I_2), wobei das Verhältnis R von der Gesamthöhe des Signals unabhängig ist und nur eine Funktion des zu bestimmenden chemischen Parameters darstellt;

Fig. 5 zeigt pH-Calibrierkurven eines pH-Sensors nach Beispiel 1 mit unterschiedlicher Menge an HPTS (A: wenig HPTS; B: viel HPTS), gemessen als Phasenverschiebung bei einer Modulationsfrequenz von 80 kHz. Als Lichtquelle dient hier eine blaue LED und als Detektor eine Photodiode; und

Fig. 6 zeigt vier Kombinationsmöglichkeiten des kurzlebigen chemisch sensitiven Leuchtstoffs (A) und des inertten langlebigen Leuchtstoffs (B) in einem optischen Sensor.

Als für den Analyten inerte Leuchtstoffe mit langen Abklingzeiten kommen z. B. in Frage:

- Übergangsmetallkomplexe mit Ruthenium (II), Rhenium (I) oder Osmium und Iridium als Zentralatom und Diiminliganden;
- phosphoreszierende Porphyrine mit Platin, Palladium, Lutetium oder Zinn als Zentralatom;
- phosphoreszierende Komplexe der Seltenerden wie Europium, Dysprosium oder Terbium;
- phosphoreszierende Kristalle wie Rubin, Cr-YAG, Alexandrit oder phosphoreszierende Mischoxide wie Magnesiumfluorgermanat

Als kurzlebige fluoreszierende Leuchtstoffe kommen alle Farbstoffe in Frage, deren Anregungs- und Emissionsspektrum mit einem der oben zitierten langlebigen Leuchtstoffe überlappt und deren Fluoreszenzintensität vom zu bestimmenden Parameter abhängig ist.

Beispiele für potentiell mögliche Leuchtstoff- bzw. Luminophor/Fluorophorpaare sind:

Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)/HPTS
 Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)/Fluorescein
 Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)/Rhodamin B

Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)/Rhodamin B-octadecylester
 Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)/Hexadecyl-Acridinorange
 Europium(III)-tris-theonyl-trifluormethylacetat/Hydroxymethylcoumarin
 Platin(II)-tetraphenylporphyrin/Rhodamin B

- 5 Platin(II)-tetraphenylporphyrin/Naphtofluorescein
 Platin(II)-tetraphenylporphyrin/Sulforhodamin 101
 Platin(II)-octaethylporphyrin/Eosin
 Platin(II)-octaethylporphyrin/Thionin
 10 Platin(II)-octaethylketoporphyrin/Nilblau
 Cr(III)-YAG/Nilblau
 Cr(III)-YAG/Naphtofluorescein

Der langlebige Leuchtstoff kann auf unterschiedliche Weise in den Sensor integriert werden (Abb. 6):

- 15 – durch direktes Lösen des Leuchtstoffs in der analytsensitiven Schicht (Fig. 6, Bsp. 3)
 – durch Einbau in ein Polymer, welches als Grundierung für die Sensorschicht dient (Fig. 6, Bsp. 1)
 – durch Einbau in ein Polymer, welches in Mikro- oder Nanopartikeln in die sensitive Schicht dispergiert wird (Fig. 6, Bsp. 2)
 – durch Einbau von lumineszierenden Farbstoffen in Sol-Gel Glas mit anschließendem Sintern, Pulverisieren und
 20 Dispergieren des Glases in der Sensorschicht (Fig. 6, Bsp. 2)
 – durch Verwendung pulverisierter Phosphore, die in der sensitiven Schicht dispergiert werden (Fig. 6; Bsp. 2)
 – durch Beschichtung der Außenseite einer Sensorfolie, ohne Kontakt zur Probe (Fig. 6, Bsp. 4)
 – durch kovalente oder elektrostatische Bindung des Fluoreszenzindikators an die Oberfläche von Leuchtstoffpartikeln, die entweder in eine Polymerschicht dispergiert werden oder direkt in der Probe verteilt werden
 25 – durch Dispersion von Partikeln in die Probe, in welcher der Fluoreszenzindikator in gelöster Form vorliegt.

Es ist wichtig zu erwähnen, daß mit Hilfe von Phasenmodulationstechniken bei Frequenzen im kHz-Bereich bei dieser Art von Sensoren immer nur eine mittlere Phasenverschiebung ermittelt werden kann. Ein Aufsplitten in beide Abklingzeitkomponenten ist zwar prinzipiell möglich, durch die benötigten hohen Frequenzen aber meßtechnisch aufwendig. Aufgrund der deutlichen Unterschiede in den Abklingzeiten der beiden co-immobilisierten Indikatoren ergibt die zeit-
 30 aufgelöste Messung, bei der nach einem Anregungslichtpuls ausschließlich das Abklingverhalten des Lumineszenzsignals nach Ausschalten des Anregungspulses ermittelt wird, in vielen Fällen keinen nutzbringenden Parameter, da die kurzlebige Komponente zu schnell abklingt und meßtechnisch nur mit hohem Aufwand erfaßt werden kann.

Auch ist es möglich, die Signalintensität während des Anregungspulses und in der Abklingphase separat zeitaufgelöst zu messen und das Verhältnis dieser beiden Signale R zu berechnen. Wie aus Fig. 4 hervorgeht, hängt dieses Verhältnis
 35 ausschließlich vom Intensitätsverhältnis R der beiden Lumineszenzkomponenten ab und ist vollständig unabhängig von der Gesamtintensität des Signals.

Desweiteren kann mit Phasenmodulationstechniken die mittlere Phasenverschiebung des Lumineszenzsignals gemessen werden. Die Meßfrequenz wird dabei auf die Abklingzeit des Leuchtstoffs abgestimmt und liegt zwischen 0,5 und
 40 100 kHz. Wie im folgenden gezeigt wird, geht aus der Gleichung (1) hervor, daß der gemessene Phasenwinkel Φ_m nur vom Verhältnis der beiden Signalintensitäten, aber nicht von der Absoluthöhe des Signals abhängt und somit die Referenzierung der Intensität des kurzlebigen Fluoreszenzanteils ermöglicht.

Voraussetzung 1:

Additive Überlagerung der Signale (Index ref = Referenzsignal, Index flu = Fluoreszenzsignal; Index m = Meßgröße)

45
$$A_m \cdot \cos\Phi_m = A_{ref} \cdot \cos\Phi_{ref} + A_{flu} \cdot \cos\Phi_{flu}$$

$$A_m \cdot \sin\Phi_m = A_{ref} \cdot \sin\Phi_{ref} + A_{flu} \cdot \sin\Phi_{flu}$$

50 Voraussetzung 2:

Die längere Abklingzeit ist sehr viel größer als die kürzere Abklingzeit:

$$\tau_{ref} \gg \tau_{flu}$$

55 Wenn die Modulationsfrequenz so gewählt ist, daß sie für T_{ref} optimal ist, d. h.

$$\tan\Phi_{ref} = 2\pi \cdot f_{mod} \cdot \tau_{ref} = 1$$

ergibt sich für Φ_{flu} :

60
$$\tan\Phi_{flu} = 2\pi \cdot f_{mod} \cdot \tau_{flu} = \frac{2\pi \cdot \tau_{flu}}{2\pi \cdot \tau_{ref}} = \frac{\tau_{flu}}{\tau_{ref}}$$

65 mit der Voraussetzung ergibt sich für den Winkel Φ_{flu} :

$$\tan \Phi_{flu} = \frac{\tau_{flu}}{\tau_{ref}} \xrightarrow{\tau_{flu} \ll \tau_{ref}} 0 \Rightarrow \Phi_{flu} \rightarrow 0$$

Voraussetzung 3:

Die Abklingzeit des Farbstoffs mit der längeren Abklingzeit ist für die interessierende Messung konstant:

$$\tau_{ref} = \text{konstant} \rightarrow \tan \Phi_{ref} = \text{konstant} \rightarrow \Phi_{ref} = \text{konstant}$$

Damit vereinfachen sich die additiven Gleichungen zu:

$$A_m \cdot \cos \Phi_m = A_{ref} \cdot \cos \Phi_{ref} + A_{flu}$$

$$A_m \cdot \sin \Phi_m = A_{ref} \cdot \sin \Phi_{ref}$$

Teilt man die erste Gleichung durch die zweite, ergibt sich:

$$\frac{A_m \cdot \cos \Phi_m}{A_m \cdot \sin \Phi_m} = \cot \Phi_m = \frac{A_{ref} \cdot \cos \Phi_{ref} + A_{flu}}{A_{ref} \cdot \sin \Phi_{ref}} = \frac{A_{ref}}{A_{ref}} \cdot \left(\frac{\cos \Phi_{ref} + A_{flu} / A_{ref}}{\sin \Phi_{ref}} \right)$$

$$\cot \Phi_m = \frac{\cos \Phi_{ref} + A_{flu} / A_{ref}}{\sin \Phi_{ref}} = \cot \Phi_{ref} + \frac{1}{\sin \Phi_{ref}} \cdot A_{flu} / A_{ref} \quad (1)$$

Da die Auftragung von $\cot \Phi_m$ linear das Amplitudenverhältnis widerspiegelt, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Cotangens des gemessenen Phasenwinkels Φ_m und dem Amplitudenverhältnis R (und damit auch Intensitätsverhältnis) der beiden Leuchtstoffe siehe Fig. 2).

$\cot \Phi_m$ drückt ein Intensitätsverhältnis aus, ohne daß zwei Intensitätssignale separat gemessen werden müssen.

Wesentliche Vorteile sind:

- Ein sehr geringer Synthese- und Optimierungsaufwand bei der Herstellung neuer Sensoren.
- Einfache Umstellung bereits optimierter Fluoreszenzsensoren auf Abklingzeitmessung durch einfaches Zumischen des langlebigen Leuchtstoffs.
- Für ein Feld von Sensoren für unterschiedliche Analyten kann problemlos immer der gleiche langlebige Leuchtstoff verwendet werden. Damit lassen sich verschiedene Sensoren mit demselben optoelektronischen System auswerten.
- Da die Form der Kalibrierkurve nur vom Verhältnis der beiden Intensitäten abhängt, kann der Empfindlichkeitsbereich eines einzelnen Sensors allein schon durch Veränderung der zugegebenen Menge an Leuchtstoff optimiert werden.
- dasselbe kann durch eine optimale Auswahl der spektralen Fenster sowohl auf der Seite der Anregung, als auch der Emission realisiert werden.
- Die Querempfindlichkeit langlebiger Lumineszenz gegenüber Sauerstoff kann ausgeschaltet werden, indem die Indikatoren in Materialien eingebaut werden, die für Gase nicht zugänglich sind.
- Werden phosphoreszierende Feststoffe oder in Glas eingebaute Leuchtstoffe verwendet, wird jegliche Beeinflussung des Signals durch chemische Leuchtstoffparameter in der Probe vollständig ausgeschlossen.
- Weil Sauerstoff die Lumineszenz nicht löschen kann, entsteht in der Membran kein reaktiver Singlettsauerstoff. In der Folge verringert sich die Photozersetzung und die Stabilität der Sensoren verbessert sich.
- Der Einbau der langlebigen Leuchtstoffe in eine Glasmatrix oder als Feststoff verhindert deren Auswaschen vollständig. Desweiteren ist ihre Photostabilität außergewöhnlich hoch.
- Während bei Meßprinzipien, bei denen der Analyt den angeregten Zustand des langlebigen Leuchtstoffs deaktiviert (wie PET-Effekt, dynamischer Löschung oder Energietransfer), die Abnahme der mittleren Abklingzeit, immer parallel mit einer Abnahme der Signalintensität verbunden ist, was zu einer Verschlechterung des Signal/Rausch Verhältnisses führt, wird bei dieser Art von Sensoren bei Abnahme der Abklingzeit die Signalintensität größer. Die Folge ist ein wesentlich besseres Signal/Rausch Verhältnis über den gesamten Meßbereich.

Da die Kennlinie dieser Sensoren einzig vom Verhältnis der Signalanteile beider Indikatoren abhängt, sollen jedoch folgende Bedingungen erfüllt sein:

- 1) keiner der beiden Indikatoren darf im Verlauf der Messung auswaschen;
- 2) die beiden Indikatoren dürfen während der Messung nicht unterschiedlich schnell durch Lichteinwirkung zersetzt werden;
- 3) das Konzentrationsverhältnis der beiden Indikatoren muß beim Herstellen der Membranen konstant gehalten werden;
- 4) die Abklingzeit des langlebigen Leuchtstoffs muß immer konstant sein.

Für viele Sensoren können diese Bedingungen problemlos erfüllt werden.
Beispiele für optische Sensoren basierend auf diesem Prinzip:

pH-Sensor

- HPTS adsorbiert an Zellulose mit quarternären Ammoniumgruppen und eingebaut in Poly-hydroxyethylmethacrylat (PHEMA) Hydrogel
- $\text{Ru(phen)}_3\text{Cl}_2$ in Sol-Gel (gesintert, gemahlen und im Hydrogel dispergiert) (Fig. 5 zeigt die Kalibrierkurve dieses Sensors, gemessen als Phasenverschiebung bei einer Frequenz von 80 kHz)

pH-Sensor

- Aminofluorescein kovalent gekoppelt an Sol-Gel Partikel mit eingebautem $\text{Ru(phen)}_3\text{Cl}_2$ (gesintert, gemahlen und in Hydrogel dispergiert)

 CO_2 -Sensor

- HPTS- CTA_3 Ionenpaar in Ethylcellulose gelöst mit Tetraoctylammoniumhydroxid als Puffer (nach 6)
- $\text{Ru(4,7-diph-1,10-phen)}$ in PVC als äußere Beschichtung einer Sensorfolie

 NH_3 -Sensor

- Rhodamin B gelöst in PVC mit NPOE (nach 7)
- $\text{Pt(II)-tetra-pentafluorophenyl-porphyrin}$ in PVC als äußere Beschichtung einer Sensorfolie

Kalium-Sensor

- lipophilisiertes Nilblau gelöst in PVC mit Weichmachern (nach 8)
- $\text{Pt(II)-octaethylketoporphyrin}$ in PVC als äußere Beschichtung

Die Erfindung erlaubt somit eine optische Bestimmung eines chemischen biologischen oder physikalischen Parameters einer Probe mit Hilfe eines optischen Sensors. Im Sensor liegen zwei Lumineszenzindikatoren coimmobilisiert vor, von denen der eine Indikator als Träger eines Untergrundlumineszenzsignals fungiert, welches durch eine lange Lumineszenzlebenszeit (vorzugsweise im Bereich von mindestens 100 Nanosekunden bis zu einigen Millisekunden) gekennzeichnet ist, und welches weder in seiner Intensität noch in seiner Abklingzeit vom zu messenden Parameter beeinflusst wird. Der zweite Indikator weist eine kürzerlebige Fluoreszenz vorzugsweise im Bereich von einigen Nanosekunden auf, welche das langlebige Lumineszenzsignal überlagert, und deren Intensität eine Funktion des zu messenden Parameters ist. Mit Hilfe von Phasenmodulations- oder zeitaufgelösten Meßmethoden wird dabei eine Referenzgröße bestimmt, welche das Verhältnis der beiden einzelnen Lumineszenzintensitätsanteile ausdrückt, wobei diese Referenzgröße unabhängig von der Gesamtintensität des Lumineszenzsignals ist, und damit die Referenzierung der kurzlebigen vom Analyten abhängigen Fluoreszenzkomponente ermöglicht.

Zitate

1. O. S. Wolfbeis, Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors Vol. II, CRC press, 1991
2. S. Draxler, M.E. Lippitsch, Sens. Actuators B29, 199, 1995
3. J.R. Lakowicz, H. Szmecinski, Sens. Actuators B11, 133, 1993
4. J.R. Lakowicz, H. Szmecinski, M. Karakelle, Anal. Chim Acta 272, 179, 1993
5. J. Sipior, S. Bambot, M. Romauld, G.M. Carter, J.R. Lakowicz, G. Rao, Anal. Biochem. 227, 309, 1995
6. A. Mills, Q. Chang, Analyst, 118, 839, 1993
7. C. Preininger, G.J. Mohr, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, Anal. Chim. Acta, 334, 113, 1996
8. U.E. Spichinger, D. Freiner, E. Bakker, T. Rosatzin, W. Simon, Sens. Actuators B11, 262, 1993

Patentansprüche

1. Verfahren zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen, chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe unter Verwendung zumindest zweier verschiedener Leuchtstoffe (flu, ref), deren erster (flu) zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht und deren zweiter (ref) zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den Parameter nicht anspricht, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Leuchtstoffe (flu, ref) unterschiedliche Abklingzeiten aufweisen und das Zeit- oder Phasenverhalten der sich ergebenden Lumineszenzantwort zur Bildung einer Referenzgröße (R) für die Bestimmung des Parameters verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Referenzgröße ein Verhältnis (R) der beiden Lumineszenzintensitätsanteile verwendet wird, welches unabhängig von der Gesamtintensität der Lumineszenzsignale ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Abklingzeit des zweiten Leuchtstoffs (ref) länger ist als die des ersten Leuchtstoffs (flu).
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Leuchtstoffe (flu, ref)

coimmobilisiert vorliegen.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Referenzgröße (R) eine Phasenverschiebung (Φ_m) der Lumineszenzantwort des ersten Leuchtstoffs (flu) zu der des zweiten Leuchtstoffs (ref) verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzgröße (R) aufgrund des Zeitverlaufs der Lumineszenzantwort des zweiten Leuchtstoffs (ref) bestimmt wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Abklingzeit des ersten Leuchtstoffs (flu) im Bereich von 0,3 Nanosekunden bis zu etwa 100 Nanosekunden liegt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Leuchtstoff (ref) als Träger eines Untergrund-Lumineszenzsignals fungiert, wobei insbesondere die Abklingzeit des zweiten Leuchtstoffs (ref) im Bereich von 1 Nanosekunden bis 10 Millisekunden liegt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungs- oder/und Emissionsspektren der Leuchtstoffe (flu, ref) einander überlappen.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Leuchtstoffe (flu, ref) gleichzeitig, insbesondere mit gleichzeitigem Erregungsanfang oder/und gleicher Erregungsdauer, erregt werden.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Parametermeßgröße (A_{flu}) sowie die Referenzgröße (A_{ref}) aus einem Summensignal (A_{ges}) der sich ergebenden gemeinsamen Lumineszenzantwort ermittelt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Leuchtstoffe (flu, ref) durch eine einzige Lichtquelle gemeinsam erregt werden.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lumineszenzantworten der Leuchtstoffe (flu, ref) durch einen einzigen Detektor gemeinsam erfaßt werden.
14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als die Referenzgröße (R) die gemessene Phasenverschiebung (Φ_m) des Summensignals (ges) aus Fluoreszenzsignal (flu) und verzögertem Referenzsignal (ref) verwendet wird und somit das Verhältnis der beiden Anteile widerspiegelt.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationsfrequenz auf die Abklingzeit des jeweiligen längerlebigen Leuchtstoffs (ref) abgestimmt wird, und insbesondere im Bereich zwischen 0,5 und 300 kHz liegt.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzgröße (R) mit Hilfe einer zeitaufgelösten Messung ermittelt wird, wobei die Referenzgröße (R) ein Verhältnis zwischen der Lumineszenzintensität (I_1) während des Anregungsimpulses und der Lumineszenzintensität (I_2) nach dem Ausschalten der Lichtquelle darstellt.
17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) an der Oberfläche von Partikeln, die den langlebigen Leuchtstoff (ref) enthalten, fixiert ist und die Partikel ohne zusätzlichen Träger direkt in die Probe eingebracht werden.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die in die Probe eingebrachten Partikel mit einem Flow-Cytometer vermessen werden.
19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die in die Probe eingebrachten Partikel mit einem Fluoreszenzmikroskop vermessen werden.
20. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensoren mit Hilfe von bildgebenden Methoden zweidimensional ausgelesen werden.
21. Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen, chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe, umfassend:
ein Sensormittel, das zumindest zwei verschiedene Leuchtstoffe (flu, ref) aufweist, deren erster (flu) zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht und deren zweiter (ref) zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den Parameter nicht anspricht, dadurch gekennzeichnet, daß die Leuchtstoffe (flu, ref) unterschiedliche Abklingzeiten aufweisen und das Zeit- oder Phasenverhalten der sich ergebenden Lumineszenzantwort zur Bildung einer Referenzgröße (R) für die Bestimmung des Parameters verwendet wird.
22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Abklingzeit des zweiten Leuchtstoffs (ref) länger ist als die des ersten Leuchtstoffs (flu).
23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Leuchtstoffe (flu, ref) coimmobilisiert vorliegen.
24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Referenzgröße (R) aufgrund einer Phasenverschiebung (Φ_m) der Lumineszenzantwort des ersten Leuchtstoffs (flu) zu der des zweiten Leuchtstoffs (ref) bestimmt.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzgröße (R) aufgrund des Zeitverlaufs der Lumineszenzantwort des zweiten Leuchtstoffs (ref) bestimmt wird.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregungs- oder/und die Emissionsspektren der Leuchtstoffe (flu, ref) einander überlappen.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Leuchtstoffe (flu, ref) gleichzeitig, insbesondere mit gleichzeitigem Erregungsanfang oder/und gleicher Erregungsdauer, erregt werden.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Parametermeßgröße (A_{flu}) sowie die Referenzgröße (A_{ref}) aus einem Summensignal (A_{ges}) der sich ergebenden gemeinsamen Lumineszenzantwort ermittelt wird.
29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Leuchtstoffe (flu, ref) durch eine einzige Lichtquelle gemeinsam erregt werden.
30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Lumineszenzantworten der Leuchtstoffe (flu, ref) durch einen einzigen Detektor gemeinsam erfaßt werden.

31. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der langlebige Leuchtstoff (ref) in einer Grundierungsschicht immobilisiert ist, welche von der chemisch sensitiven Schicht, die den kurzlebigen Leuchtstoff (flu) enthält, überzogen ist.
32. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der langlebige Leuchtstoff (ref) in pulverisierter Form vorliegt und in einer chemisch sensitiven Schicht, die den kurzlebigen Leuchtstoff (flu) enthält, dispergiert ist.
33. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der langlebige Leuchtstoff (ref) zusammen mit dem kurzlebigen Leuchtstoff (flu) in einer gemeinsamen Trägerschicht immobilisiert ist.
34. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der langlebige Leuchtstoff (ref) an der Außenseite einer Trägerschicht für die sensitive Schicht, die den kurzlebigen Leuchtstoff (flu) enthält, immobilisiert ist.
35. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) an der Oberfläche von Partikeln, die den langlebigen Leuchtstoff (ref) enthalten, fixiert ist.
36. Vorrichtung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel in eine für den zu messenden Parameter durchlässige Matrix eingebettet sind.
37. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der langlebige Leuchtstoff (ref) aus der Gruppe der lumineszierenden Übergangsmetallkomplexe mit Ru, Re, Os, Rh, Ir oder Pt als Zentralatom und α -Diiminliganden stammt.
38. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der langlebige Leuchtstoff (ref) aus der Gruppe der phosphoreszierenden Porphyrine mit Pt, Pd, Lu und Sn als Zentralatom stammt.
39. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der langlebige Leuchtstoff (ref) ein phosphoreszierender Feststoff wie Cr(II)-YAG oder Alexandrit ist.
40. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der insbesondere zur zeitaufgelösten Messung dienende langlebigen Leuchtstoff in Sol-Gel eingebettet wird, welches anschließend gesintert, gemahlen und in eine das kurzlebige Leuchtstoff (flu) enthaltende sensitive Schicht eingebettet wird.
41. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der zu messende chemische Parameter in der Probe der pH-Wert, die Konzentration bestimmter verschiedener ionischer Verbindungen wie z. B. Kalium, Calcium, Nitrat, Chlorid und verschiedener Schwermetalle oder die Konzentration gasförmiger Komponenten wie z. B. CO₂ und NH₃ oder das Redoxpotential ist.
42. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der zu messende biologische Parameter ein mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Antikörper oder Antigen ist.
43. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) ein pH-sensitiver Fluoreszenzindikator ist.
44. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) ein chelatbildender Fluoreszenzindikator ist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

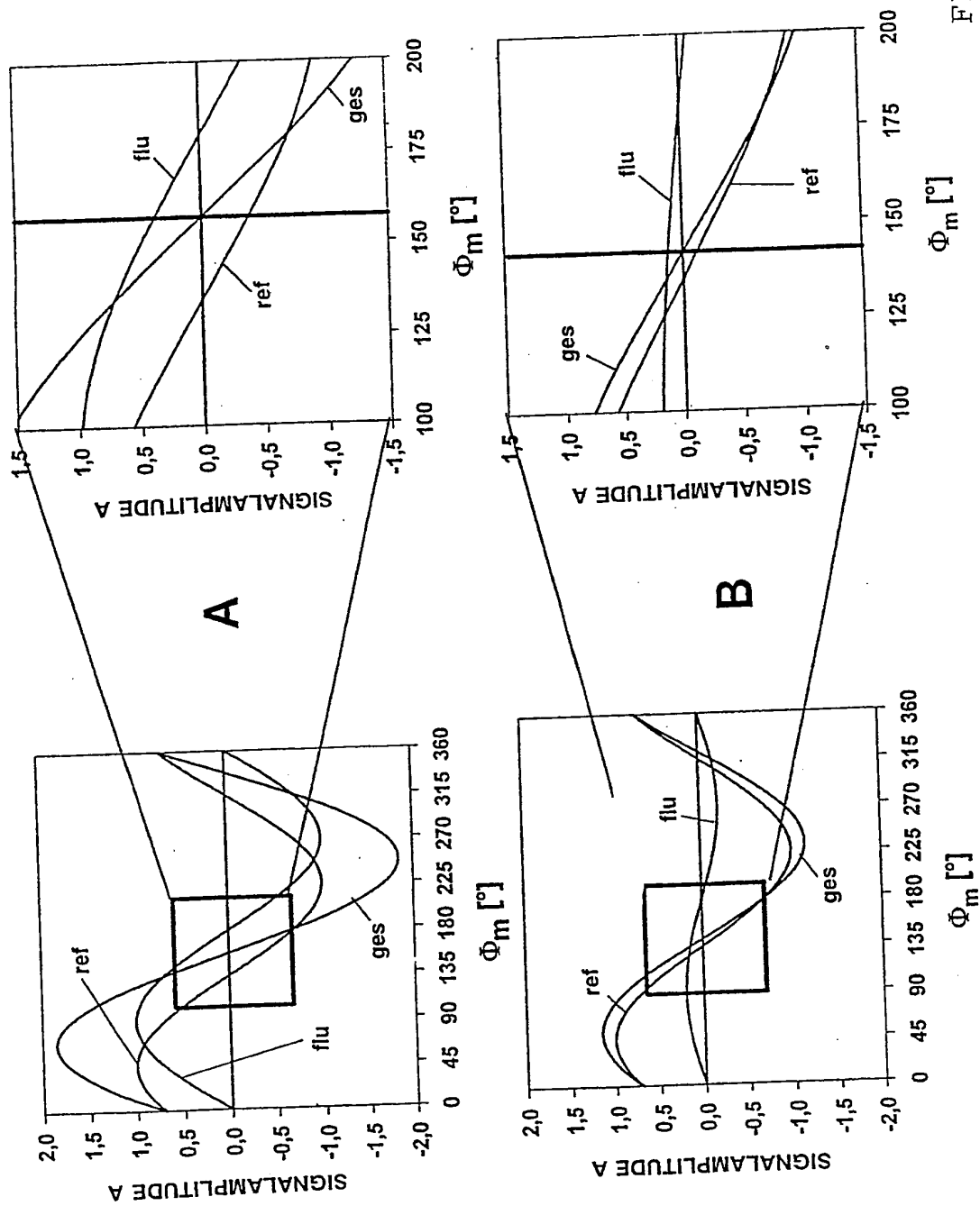


FIG. 1

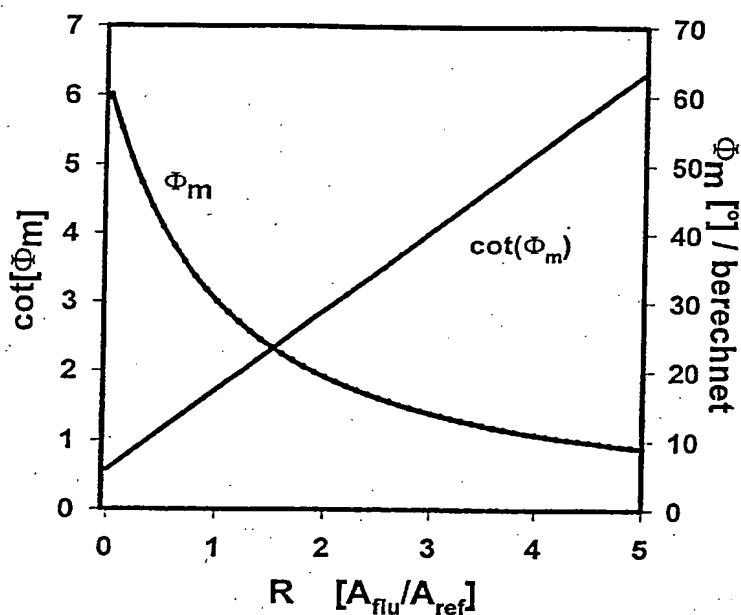


FIG. 2

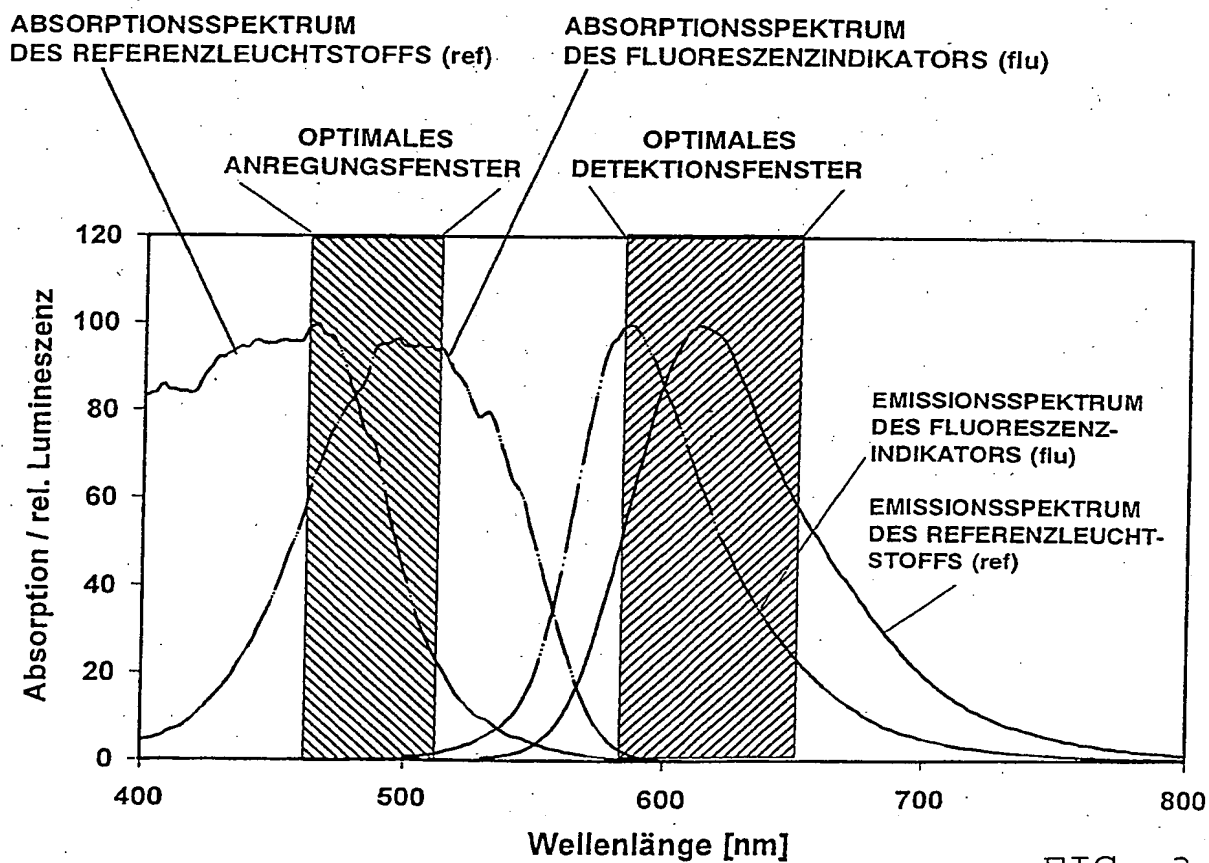


FIG. 3

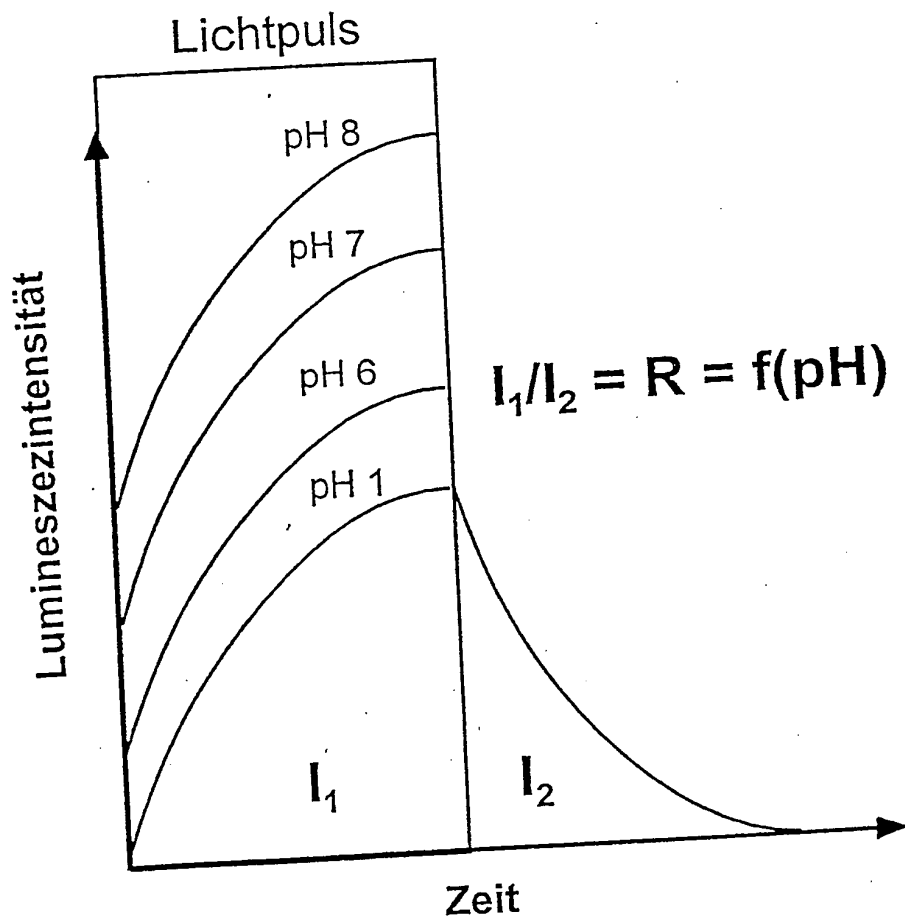


FIG. 4

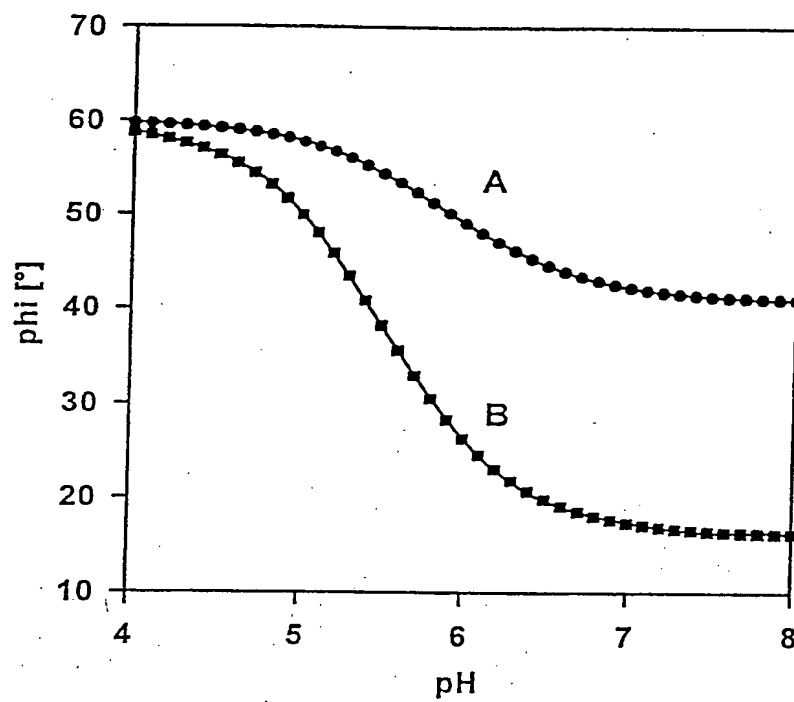


FIG. 5

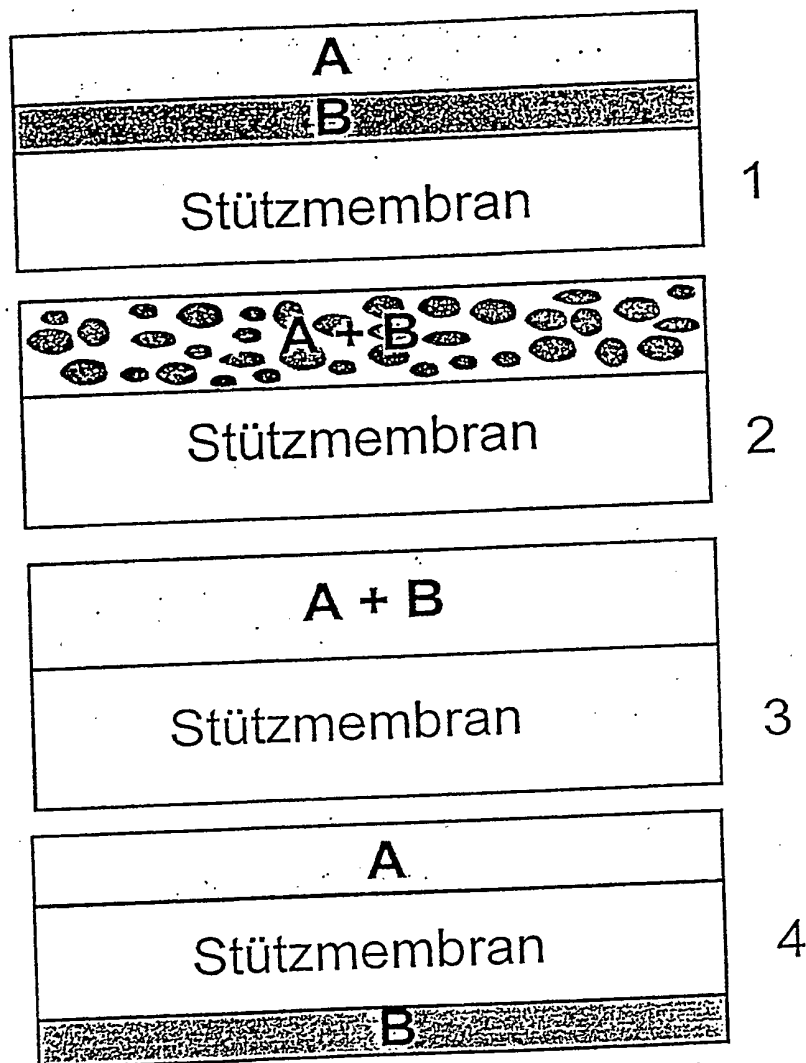


FIG. 6